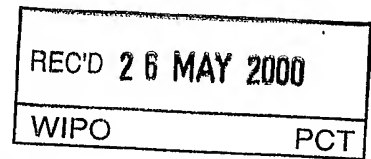


**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



DE 00/244

4

**Bescheinigung**

Die Herren Dr. Roland K r e u t z e r in Weidenberg/Deutschland und Dr. Stefan L i m m e r in Bayreuth/Deutschland haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens"

am 30. Januar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 61 K und A 61 P der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 11. Mai 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 03 713.2

Weihmayer



### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

# Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung  
5 doppelsträngiger Oligoribonukleotide.

Die DE 196 31 919 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit beson-  
deren Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form ei-  
nes sie kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-Sinn-RNA  
10 handelt es sich um ein RNA-Molekül das komplementär zu Berei-  
chen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine  
Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbe-  
sondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z.B.  
Tumorerkrankungen oder viralen Infektionen, eingesetzt wer-  
den. - Die Anti-Sinn-RNA muß nachteiligerweise in einer Menge  
15 in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß  
wie die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten An-  
ti-Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.

20 Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fehlge-  
paarte doppelsträngige RNA (dsRNA) und biologisch aktive  
fehlgepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären  
Komplexes mit einem oberflächenaktiven Mittel enthält. Die  
dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten  
25 Nukleinsäureeinzelsträngen ohne definierte Basensequenz. Die  
Einzelstränge gehen zufällige Basenpaarungen miteinander ein,  
so dass fehlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die be-  
kannte dsRNA dient zur Hemmung der Vermehrung von Retroviren,  
wie HIV. Das Genom von Retroviren besteht aus doppelsträngi-  
ger RNA, die während der Vermehrung des Retrovirus verschie-  
dene Proteine bindet. Die Bindung dieser Proteine und damit  
30 die Vermehrung des Virus kann gehemmt werden, wenn unspezifi-  
sche dsRNA in hohen Konzentrationen in die infizierten Zellen

einggebracht wird. Es kommt dabei zu einer Konkurrenz der unspezifischen dsRNA mit der doppelsträngigen Virus-RNA. Der hemmende Effekt bzw. die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist gering.

5

Aus Fire, A. et.al, NATURE, Vol. 391, pp. 806 ist es bekannt, dass dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, dass die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA zurückzuführen ist. - Über die Wirksamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der Genexpression, insbesondere in humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts ausgesagt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst wirksames Medikament bzw. eine möglichst wirksame Verwendung zur Herstellung eines Medikaments angegeben werden, mit dem/der eine Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens bewirkbar ist.

25 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 13 und 14 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 3 bis 12 und 15 bis 26.

30 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Es hat sich überraschend gezeigt, dass

dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in humanen Zellen eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens  
5 eine Größenordnung niedriger sind. Das erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.

10 Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Das vorgeschlagene Medikament weist die vorgenannten Vorteile  
15 auf. Durch die Verwendung eines Vektors können insbesondere Herstellungskosten eingespart werden.

Sofern dsRNA als Wirkstoff benutzt wird, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dass die dsRNA verpackt in micellare  
20 Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA kann gleichfalls in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. - Die vorgenannten Merkmale ermöglichen ein Einschleusen  
25 der dsRNA in vorgegebene Zielzellen.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal weist die dsRNA  
30 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare auf. Eine solche dsRNA bzw. ein zur Kodierung derselben vorgesehener Vektor können synthetisch bzw. enzymatisch mit gängigen Verfahren hergestellt werden.

Das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, kann in eukaryontischen Zellen oder in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar sein. Es kann Bestandteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder Viroids sein.

- 5 - Das vorgeschlagene Medikament erlaubt die Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z.B. Krebs und viraler Erkrankungen.

10 Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein. In diesem Fall erlaubt das erfindungsgemäße Medikament auch die Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten.

15 Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Ihre Enden können zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sein. Dadurch wird ein enzymatischer Angriff erschwert.

20 Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Überraschenderweise eignet sich dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens. Bei einer Verwendung von dsRNA wird die Hemmung im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide schon bei um eine Größenordnung geringeren Konzentrationen bewirkt. Die erfindungsgemäße Verwendung ermöglicht also die Herstellung besonders wirksamer Medikamente.

30

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide

(dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Die Verwendung eines Vektors ermöglicht die Herstellung besonders preisgünstiger und wirksamer Medikamente.

Hinsichtlich der verwendungsgemäßen Ausgestaltungen wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

#### 10 Ausführungsbeispiel:

Mittels herkömmlicher Verfahren ist ein aus dem einzigen Sequenzprotokoll ersichtlicher RNA-Einzelstrang enzymatisch synthetisiert worden.

15

Ferner ist der dazu komplementäre RNA-Einzelstrang synthetisiert worden. Anschließend sind der Einzelstrang und der dazu komplementäre Einzelstrang zur dsRNA vereinigt worden. Die so hergestellte dsRNA enthält einen Abschnitt des "immediate early gene" des Cytomegalievirus.

20

#### Versuchsprotokoll:

Es wurde ein Plasmid-Vektor konstruiert, unter dessen Verwendung die benötigte dsRNA hergestellt werden konnte. Für die Konstruktion dieses T7/SP6-Transkriptionsplasmides wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der 363 Basenpaare vom 5'-Ende des "immediate early gene's" des Cytomegalievirus durchgeführt. Als Matrize diente käuflich erwerbliche "positive control DNA" aus dem Cytomegalievirus des HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro Transkriptionskit's der Fa. Promega. Als Primer dienten Oligodesoxyribonukleotide, deren Sequenz identisch mit bzw. komplementär zu den Enden des oben angegebenen Bereichs des "immediate early gene's"

25

30

waren. Als Klonierungsvektor für das erhaltene PCR-Produkt diente der Vektor pGEM®-T (Fa. Promega). Es erfolgte Transformation von *E. coli* XL1-blue. Plasmid-DNA eines ausgewählten Klons, deren Sequenz durch partielle Sequenzierung überprüft worden war, wurde mit *Nco*I bzw. *Sal*I linearisiert und als Matrize für eine *in vitro*-Transkription mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase verwendet (RiboMAX™ *in vitro*-Transkriptionskit, Fa. Promega).

Die erhaltenen Oligoribonukleotide wurden gereinigt und in Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) in Gegenwart von 100 mM NaCl in äquimolaren Mengen zusammengegeben. Nach kurzem Erhitzen auf 95°C wurde die Mischung über einen Zeitraum von ca. 2,5 Stunden langsam abgekühlt, wodurch die Bildung von dsRNA durch Paarung der beiden komplementären Einzelstränge erreicht wurde.

#### Testsystem mit menschlichem Zellkernextrakt:

Unter Verwendung des HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit's der Fa. Promega wurde die Transkriptionseffizienz des oben angegebenen Bereichs des "immediate early gene's" des Cytomegalievirus in Gegenwart der beiden einzelsträngigen Oligoribonukleotide sowie der dsRNA bestimmt. Dies erfolgte anhand der in die "run off"-Transkripte inkorporierten Radioaktivität des als Substrat verwendeten [ $\alpha^{32}$ P] ATP. Die Trennung des freien ATP vom entstandenen Transkript wurde mittels Gelelektrophorese vorgenommen. Die Auswertung des Gels erfolgte mit Hilfe eines Radioaktivitätsdetektors (Instant-Imager).

#### Ergebnis und Schlussfolgerung:

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von dsRNA im Vergleich zum Kontrol-



lansatz ohne RNA sowie auch zu den Ansätzen mit einzelsträngiger RNA. Die Wirksamkeit der dsRNA war schon bei Zugabe von geringen Mengen, nämlich weniger als 10% der bei der Antisinn-Technologie zur Hemmung der Translation erforderlichen RNA-Konzentration, zu erreichen. Der hemmende Effekt einzelsträngiger Antisinn-RNA wäre in diesem Testsystem nicht nachzuweisen, da hierbei die Inhibition auf der Ebene der Translation stattfindet. Hier wurde die Transkription untersucht. Die hiermit erstmals beim Menschen beobachtete Reduzierung der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA zeigt deutlich eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

# Patentansprüche

1. Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.
2. Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.
3. Medikament nach Anspruch 1, wobei die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
4. Medikament nach Anspruch 1, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare aufweist.
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
- 5 9. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 10 10. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 15 11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 20 12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sind.
- 25 13. Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.
- 30 14. Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

15. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die dsRNA verpackt in micellaren Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 5 16. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 10 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare aufweist.
- 15 18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.
- 20 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei das zu hemmende Gen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
- 25 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei das zu hemmende Gen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 30 22. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 5 24. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 23, wobei die Enden der dsRNA zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sind.
- 10 25. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei das Medikament in die Blutbahn oder das Interstitium des zu therapierenden Organismus injizierbar ist.
- 15 26. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 25, wobei die dsRNA bzw. der sie kodierende Vektor in Bakterien oder Mikroorganismen aufgenommen sind.

# SEQUENZPROTOKOLL

<110> Kreutzer, Roland  
Limmer, Stefan

<120> Medikament zur Hemmung der Expression eines  
vorgegebenen Gens

<130> 380606

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:  
sythetische dsRNA

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: dsRNA

<400> 1

```
tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60
gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgatcatc tcggcaccgt caccctggat 120
gctgtaggca taggcttggg tatgccgta ctgccgggcc tcttgcgga tatcgtccat 180
tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240
ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg gcgcgcgcc agtcctgtct 300
gcttcgttac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg 360
atc
```